

T S1/9

1/9/1 (Item 1 from file: 351)
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007313976

WPI Acc No: 1987-310983/198744

XRAM Acc No: C87-132381

**Stabilising living microbes - by mixing aq. phase contg. microbes with
oil, fat and lipophilic emulsifier to obtain water-oil-water type
emulsion**

Patent Assignee: SNOW BRAND MILK PROD CO LTD (SNOW)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 62220186	A	19870928	JP 8661398	A	19860319	198744 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8661398 A 19860319

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 62220186	A		6		

Abstract (Basic): JP 62220186 A

The method includes (a) mixing the aq. phase contg. living microbes and the oil and fat, in which lipophilic emulsifier is added, for obtaining the w/o-type emulsion contg. living microbes; and (b) mixing it with the aq. phase (outer aq. phase), in which hydrophilic emulsifier is added, uniformly for obtaining w/o/w-type emulsion. As living microbes, Bifidus bacteria can be pref. used.

USE/ADVANTAGE - By above w/o/w-type emulsion, living microbes are included in the inner aq. phase, which is covered with solidified oil and fat membrane. Thus living microbes are completely intercepted from outer aq. pahse and they can survive, even in acidic medium e.g. fermented milk, lactic acid bacterium-drink, etc.

0/0

Title Terms: STABILISED; LIVE; MICROBE; MIX; AQUEOUS; PHASE; CONTAIN;
MICROBE; OIL; FAT; LIPOPHILIC; EMULSION; OBTAIN; WATER; OIL; WATER; TYPE;
EMULSION

Derwent Class: D13; D16

International Patent Class (Additional): A23C-009/12; A23L-002/00;
C12N-001/20; C12R-001/01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): D05-H04

?

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-220186

⑤ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和62年(1987)9月28日
C 12 N 1/20 7115-4B
A 23 C 9/12 102 8114-4B
// A 23 L 2/00 F-7235-4B
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:01)

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 生菌体の安定化法

⑯ 特 願 昭61-61398

⑰ 出 願 昭61(1986)3月19日

⑱ 発 明 者 藤 原 正 弘 川越市南大塚1265-135
⑱ 発 明 者 加 固 正 敏 狭山市入間川1354-19 狭山台ハイツG302
⑱ 発 明 者 望 月 英 輔 大宮市東新井団地3-201
⑲ 出 願 人 雪印乳業株式会社 札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
⑳ 代 理 人 弁理士 宮田 広豊

明 細 書

3. 発明の詳細な説明

1. 発明の名称

生菌体の安定化法

2. 特許請求の範囲

- (1) 生菌体を含有する水相と、親油性乳化剤を添加した油脂とを混合して生菌体を包含するW/O型エマルジョンを生成し、次いで得られたW/O型エマルジョンを、親油性乳化剤を添加した水相(外水相)に均一に混合してW/O/W型エマルジョンにすることを特徴とする生菌体の安定化法。
- (2) 生菌体がビフィズス菌である特許請求の範囲第(1)項記載の生菌体の安定化法。
- (3) 油脂が30~40℃で液状状態となり、10℃以下で固化する固形脂もしくは混合油である特許請求の範囲第(1)項記載の生菌体の安定化法。
- (4) 外水相が酸性条件にある発酵乳、乳酸菌飲料もしくはその他の飲料である特許請求の範囲第(1)項もしくは第(2)項記載の生菌体の安定化法。

産業上の利用分野

本発明は、生菌体の安定化法、更に詳しくは、生菌体をW/O型エマルジョンの内水相中に包含させることにより安定化する方法に関し、特に、ビフィズス菌の如き酸性条件下で死滅し易い生菌体を含む発酵乳、乳酸菌飲料並びに酸性飲料等の製造に有利に利用される。

従来の技術

従来、生菌体を安定化法する方法としては、それが生存する環境の条件に適応し得る菌株を検索するか、生菌体を凍結乾燥菌体又は菌体顆粒として保存する方法等が採用されている。例えば酸性条件下の環境で生存が著しく損なわれるビフィズス菌については、耐酸性の高いビフィズス菌変異株(ビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT-4002)を利用する発酵乳の製造法(特開昭52-83975号)や同じく変異株(ビフィドバクテリウム・ロンガ M-8201)を食品、飼料及び整腸剤等に利用する

方法(特開昭58-224685号)、更にはビフィズス菌体に安定化剤を添加して凍結乾燥菌体として保存する方法(特開昭60-172280号)、ビフィズス菌を特定成分を添加した培地及び分散液を用いて凍結乾燥して耐酸性の高いビフィズス菌粉末を得る方法(特開昭60-188060号)、また、ビフィズス菌を保護膜を用いて菌体顆粒として保存する方法(特開昭60-141281号)等が提案されている。

しかし、これらの公知技術のうち、変異株を利用するものでは、特定の菌株に限り有効であるにすぎないうえに、その入手も極めて制約されるものであり、また、保存する方法では生菌体の生育環境条件下での安定化は期待できない。

一方、W/O/W型エマルジョンの利用については、コーヒークリームの製造法(特開昭60-16542号)、ホイップクリームの製造法(特開昭60-16546号)、比重調整クリームの製造法(特開昭60-16547号)及び合成乳(濃縮乳)の製造法(特開昭60-102137号)等に見られるごとく、いずれもクリー

させた場合、ビフィズス菌はW/O型エマルジョンに包含されているため酸性条件下にある発酵乳や酸性飲料の外水相中でも安定に生育し得ることを見出した。

また、本発明者らは、その後更に検討を進めた結果、ビフィズス菌のみならず、乳酸菌、酵母菌等の一般工業用微生物も上記と同様にしてW/O型エマルジョン内に包含させたものを外水相に分散させてW/O/W型エマルジョンを生成させると、該外水相に対して安定化させ得ることの知見を得て本発明をなすに至つた。

したがつて、本発明は、従来技術のように、特定の変異株を用いたり、また特定の安定化剤等を用いることなく、生菌体を、それを生育させるための液状媒体の酸性条件等に対して安定化し得る方法を提供することを課題とする。

以下本発明を詳しく説明する。

発明の構成

本発明の特徴は、生菌体を含有する水相と、親

ムや合成乳等の食品自体への利用であつて、生菌体の安定化に上記エマルジョンを利用することは未だ報告されていない。

このW/O/W型エマルジョンは、油相内に多数の微小水滴(内水相又は内水滴とも称せられる)が分散した形態のW/O型エマルジョンを乳化剤添加水相に分散させて生成するものであつて、上記食品への利用では、W/O型エマルジョンの生成率及び保存安定性を高めるために該エマルジョンを平均径1~5 μ m以下に微細化させている。

発明が解決しようとする課題

本発明者らは、腸内有害細菌の増殖を抑制し、ビタミン類を合成する等の整腸作用を有することから、近年、種々の乳製品、健康食品及び整腸剤等に利用されているビフィズス菌の酸性条件下での安定化について検討している過程で、ビフィズス菌の生菌体液を内水相とするW/O型エマルジョンを作成し、このW/O型エマルジョンを発酵乳、乳酸菌飲料又は酸性飲料を外水相として分散

油性乳化剤を添加した油脂とを混合して生菌体を包含するW/O型エマルジョンを生成し、得られたW/O型エマルジョンを、親水性乳化剤を添加した水相に均一に混合することによりW/O/W型エマルジョンにすることにある。

課題を解決するための手段

本発明では、まず、生菌体を含有する水相、通常は菌を培養して得られる培養液を、親油性乳化剤を添加した油脂に分散させてW/O型エマルジョンを作成する。ここで用いる油脂としては30~40℃、好ましくは35~37℃で液状状態となり、10℃以下で固化する固形脂又は混合油が好ましく、該油脂にモノグリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル等の親油性乳化剤を0.5~5重量%、好ましくは1~3重量%添加したものをを用いる。

また、上記乳化剤はHLBが4以下のものを用いるとエマルジョンの安定性が良好となる。

上記油脂に菌培養液を分散させるに当つては、

油脂を30~40℃、好ましくは35~37℃に加温して液状状態にしたものに菌培養液を逐次添加、混合するとよく、その混合割合は、目的に応じて異なるが、例えばビフィズス菌では水相：油相=5:5~1:9程度の範囲の混合割合が通している。また、上記混合はスリーワンモーター（BEIDON社）、ラボディスパー（特殊機化工業社）等の攪拌機を用い、内水相（培養液）の平均径（内水滴平均径）が5~30 μm 、好ましくは10~20 μm 程度の大液滴になるように行う。攪拌が強すぎるか、又は攪拌時間が長くなると微小水滴となつて、該水滴中の菌が損傷を受けるようになるので、必要最小限な攪拌条件を設定するようになる。例えば、ビフィズス菌では、ラボディスパーを用いて37℃で1000rpmにて攪拌する場合は5分程度の攪拌時間でよい。なお、攪拌中の水滴径は、サンプルを光学顕微鏡（倍率100~300倍）で観察して所望の径の大きになつた時点で攪拌を終了するとよい。

次に、上述のようにして得られたW/Oエマル

ジョンは35~40℃に保温し、直ちに親水性乳化剤を添加した水相（外水相）に混入し、ホモミキサー等の攪拌機もしくはホモジナイザー等の乳化機を用いて混合する。ここで用いる水相としては、例えばビフィズス菌については発酵乳、乳酸菌飲料（ドリンクヨーグルト、固形ヨーグルト）又は酸性飲料等にシュガーエステル、レシチン、グリセリン脂肪酸エステル等のような親水性乳化剤を添加したものを用いる。また、上記水相には目的に応じて、各種の安定剤、呈味料、着色料等を添加してもよい。

上記W/O型エマルジョンをこのような水相に混合するに際して攪拌作用もしくは乳化作用を強くしすぎるとW/O滴が過度に破壊されて微細な滴になりすぎてビフィズス菌のような菌を滴内に充分封入することができなくなるので留意する必要がある。したがつて、上記混合に際しては、前述のように内水滴の平均径が5~30 μm 、好ましくは10~20 μm 程度の単一な大水滴になるように

適度な攪拌又はホモゲナイズ条件を設定するとよい。しかし、このような大水滴は、攪拌に伴い油相から外水相中へ流出し易いので下記混合操作を速やかに行う必要がある。因に、上記攪拌又は乳化作用が弱すぎると大水滴の径が大きくなりすぎて相分離を起してエマルジョンが不安定になる。

上述のようにして所望の単一大水滴を形成した場合にはW/O滴の油相の厚さは約0.5~1 μm となり、上記混合が終了後直ちに10℃以下に冷却するとW/O滴の安定したW/O/W型エマルジョンからなる製品が得られる。このようなエマルジョンにおいては生菌体を包含する内水滴（内水相）が外水相と接触することがないので、例えばビフィズス菌のごとき酸性条件下の媒体中では安定的に生存できない菌でもpHの低い外水相から遮断された状態となつてその生存が維持されるようになる。

なお、内水相中の生菌体を外水相から有効に遮断するには、W/O滴の油相を固化状態に保持す

ることが必要であるので、そのためW/O型エマルジョンと外水相を均一に混合した後一定温度以下で固化する油脂を用いるのであるが、通常W/O/W型エマルジョンの保存温度は10℃程度であることから、本発明では前述のとおり、10℃以下で固化する油脂を使用する。また、一方W/O型エマルジョンの生成に際しての温度は、生菌体を死滅させない程度であることが不可欠であるので、例えばビフィズス菌等は40℃より高い温度では死滅し易いことを考慮すれば、上記エマルジョンの生成に用いる油脂は、前述したとおり40℃以下で液状状態になることが好ましく、さらに、乳化をし易くするために30~40℃、好ましくは35~37℃程度で液状となる油脂であることが特に好ましい。

以上述べたとおり、本発明によると、生菌体はW/Oエマルジョンの内水相中に封入されており、しかも内水相は固化された油脂膜により保護されて外水相と遮断されたW/O/W型エマルジョン

が得られるので、外水相が低い pH の酸性条件のような生菌体の生存を損なう条件にあつても、該エマルジョンに包含される生菌体は安定に生存し得るようになる。

したがつて、本発明に係る生菌体の安定化法をビフィズス菌の生菌体を包含する発酵乳、乳酸菌飲料及びその他の酸性飲料に利用すると保存中においても上記生菌体の生存率の高い製品を得ることができる。

また、本発明は、乳酸菌並びに酵母菌等の工業用微生物の生菌体の安定にも有効に利用し得る。

実施例と効果

以下に実施例を示して本発明とその効果を具体的に説明する。なお、本実施例はいずれもビフィズス菌の生菌体の安定化を示したものであるが、本発明はビフィズス菌の安定化に制限されるものでない。

実施例 1

高融点バターオイル 100g を加温して溶融した

に基づいて行つた。

実施例 2

実施例 1 で用いたと同様の乳化剤を添加したバターオイル 100g に、実施例 1 に記載したと同様の手順でビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC-15707 の脱脂乳における培養液の 50g を逐次添加し、W/O 型エマルジョンを得た。

次いで、シユガーエステル 0.2 重量% 添加したドリンクヨーグルト（ストレプトコッカス・サーモフィラス $6.5 \times 10^8 / \text{ml}$ 及びラクトバチルス・ブルガリクス $5.4 \times 10^7 / \text{ml}$ を含有し、砂糖 6.3 重量%、無脂乳固形分 13.6 重量%の組成を有する）500g に、37℃ の温度下に上記 W/O 型エマルジョン 150g を添加しながらホモミキサーで 1400rpm、10 分間均質化処理を行い、その後 5℃ に冷却した。

得られた W/O/W 型エマルジョン形態のヨーグルト製品（pH 4.2）を 10℃ に保持し、経日的に pH とビフィズス菌の生菌数の変化を測定した。結果は後記表に示すとおりである。

ものに、テトラグリセリンペンタステアレート（乳化剤）を 3 重量% 添加し、混合した。この乳化剤を添加したバターオイルに、それを恒温水槽中に保持して温度を調整しながら、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC-15707 をブリックスリパーブロス中で培養した生菌体液の 50g を逐次添加し、ラボテイスパーで 1000rpm、5 分間攪拌して W/O 型エマルジョンを得た。

次いで、シユガーエステルの 0.2 重量% 添加した水 500g に、37℃ の温度下で上記 W/O 型エマルジョン 150g を添加しながら、ホモミキサーで 10 分間均質化処理（3500rpm）を行い、その後 5℃ に冷却した。得られた W/O/W 型エマルジョン（pH 5.2）に酢酸を添加して pH 4.0 に調整し、10℃ に保存して経日的にビフィズス菌の生菌数を測定した。結果は後記表に示すとおりである。

なお、上記生菌数の測定は、全国はつ酵乳・乳酸菌飲料協会の「はつ酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌の検出と菌数測定法」（昭和 59 年 11 月）

実施例 3

実施例 2 と同様にして得た W/O 型エマルジョン 150g を、シユガーエステル 0.2 重量% 添加した固形ヨーグルト用ミックス（ストレプトコッカス・サーモフィラス及びラクトバチルス・アシドフィラスを $2.2 \times 10^8 / \text{ml}$ 含有し、乳脂肪 3.2 重量%、無脂乳固形分 9.5 重量%の組成を有する）500g に、37℃ の温度下に添加しながら、ホモミキサーで 5 分間均質化処理（4,000rpm）を行い、その後 5℃ に冷却した。得られた W/O/W 型製品は pH 5.6 であり、これを 37℃ で 6 時間発酵させて発酵ヨーグルト（固形ヨーグルト）にした後 10℃ に保持し、経日的に pH とビフィズス菌の生菌数の変化を測定した。結果は後記表に示すとおりである。

比較例

実施例 2 で用いたと同様のドリンクヨーグルト 500g に、実施例 1 で用いたと同様の高融点バターオイル 100g をホモミキサーで 4000rpm、5 分間

混合した後、この混合物に実施例2で用いたと同様のビフィズス菌の培養液 50gを添加し、1000rpm、

5分間攪拌した後、5℃に冷却した。

得られたヨーグルト製品中にはW/O型エマルジョンは存在せず、したがって、ビフィズス菌は pH 4.2 の外水相中に包含されている。この製品を10℃に保持し、経日的に pH とビフィズス菌の生菌数の変化を測定した。結果は下記表に併せ示した。

表

			本 発 明			比 較 例
			実施例 1	実施例 2	実施例 3	
ビフィズス菌の使用培養液			ブリックリバー プロス	脱 脂 乳	脱 脂 乳	脱 脂 乳
外水相の素材			水	ドリンク ヨーグルト	固形ヨーグルト	ドリンク ヨーグルト
W/O型エマルジョン の平均水滴径 (μm)			15	20	20	生成せず
保 存 日 数	開 始 日	pH	4.0	4.2	5.4	4.2
		生菌数 (/ml)	5.0×10^7	4.4×10^7	1.2×10^7	2.4×10^7
		生存率 (%)	100	100	100	100
	7 日	pH	4.0	4.1	4.8	4.1
		生菌数 (/ml)	5.5×10^4	2.0×10^7	6.1×10^7	4.0×10^3
		生存率 (%)	11	46	51	0.02
	14 日	pH	4.0	4.0	4.3	4.0
		生菌数 (/ml)	8.3×10^5	4.8×10^4	3.0×10^4	< 10
		生存率 (%)	1.7	11	25	0

(注) 生存率は試験開始日の生菌数に対する保存後の生菌数の百分率で示した。

手続補正書

昭和61年5月15日

表にみられるとおり、本発明によると、pH 4.0の条件下であつても生菌数は比較例に比べて高く、14日後でも約 1/100の生菌数の生存がみられる。また、pH 4.2 では14日後でも10%以上の生存がみられる。

特許庁長官 宇 賀 道 郎 殿

1. 事件の表示 昭和61年特許願第61398号

2. 発明の名称 生菌体の安定化法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

出願人 雪印乳業株式会社

代理人 宮 田 広 登

名 称 (669)雪印乳業株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都港区東新橋2丁目7番7号新橋国際ビル

郵便番号105 電話 433-7858

氏 名 (7027) 弁理士 宮 田 広 登

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 明 細 書



方式存 (印)

8. 補正の内容

明細書を下記のとおり補正する。

- (1) 特許請求の範囲の欄を別紙のとおり補正する。
- (2) 第7頁下から第7行に「するようになる。」とあるを「するようにする。」と補正する。
- (3) 第11頁第11行に「安定にも」とあるを「安定化にも」と補正する。

2. 特許請求の範囲

- (1) 生菌体を含有する水相と、親油性乳化剤を添加した油脂とを混合して生菌体を包含するW/O型エマルジョンを生成し、次いで得られたW/O型エマルジョンを、親水性乳化剤を添加した水相(外水相)に均一に混合してW/O/W型エマルジョンにすることを特徴とする生菌体の安定化法。
- (2) 生菌体がビフィズス菌である特許請求の範囲第(1)項記載の生菌体の安定化法。
- (3) 油脂が30~40℃で液状状態となり、10℃以下で固化する固形脂もしくは混合油である特許請求の範囲第(1)項記載の生菌体の安定化法。
- (4) 外水相が酸性条件にある発酵乳、乳酸菌飲料もしくはその他の飲料である特許請求の範囲第(1)項もしくは第(2)項記載の生菌体の安定化法。